



Universidade Federal da Paraíba  
Centro de Ciências da Saúde  
Departamento de Ciências Farmacêuticas  
Trabalho de Conclusão de Curso



AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA E GENOTOXICIDADE *IN VIVO* DO  
DERIVADO SEMI-SINTÉTICO CUMARÍNICO 2H-1-BENZOPIRAN-2-ONA,  
7- PRENILOXI

Ryldene Marques Duarte da Cruz  
Orientanda

Marianna Vieira Sobral  
Orientadora

João Pessoa – PB  
Dezembro – 2014

Ryldene Marques Duarte da Cruz

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA E GENOTOXICIDADE *IN VIVO* DO  
DERIVADO SEMI-SINTÉTICO CUMARÍNICO 2H-1-BENZOPIRAN-2-ONA,  
7- PRENILOXI

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao curso de Farmácia do  
Centro de Ciências da Saúde da  
Universidade Federal da Paraíba, como  
requisito para conclusão do curso de  
Farmácia (Generalista).

Orientadora: Marianna Vieira Sobral

João Pessoa - PB

2014

C957a Cruz, Ryldene Marques Duarte da.

Avaliação da toxicidade aguda e genotoxicidade *in vivo* do derivado semi-sintético cumarínico *2h-1-benzopiran-2-ona, 7-preniloxi* / Ryldene Marques Duarte da Cruz. -- João Pessoa: [s.n.], 2015.

29f.: il. -

Orientadora: Marianna Vieira Sobral.

Monografia (Graduação) – UFPB/CCS.

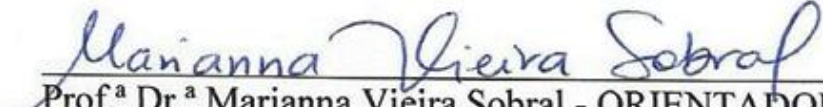
1. Derivado cumarínico. 2. 2H-1-Benzopiran-2-ona. 3. 7-preniloxi.

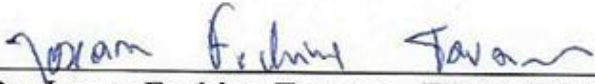
Ryldene Marques Duarte da Cruz

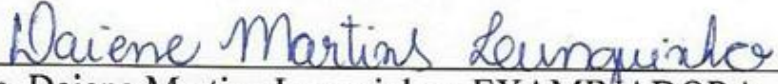
AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA E GENOTOXICIDADE *IN VIVO* DO  
DERIVADO SEMI-SINTÉTICO CUMARÍNICO 2H-1-BENZOPIRAN-2-ONA,  
7- PRENILOXI

Aprovado em 11/12/2014

Banca examinadora:

  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marianna Vieira Sobral - ORIENTADORA  
Universidade Federal da Paraíba – UFPB

  
Prof. Dr. Josean Fecine Tavares – EXAMINADOR  
Universidade Federal da Paraíba – UFPB

  
Msc. Daiene Martins Lunguinho - EXAMINADORA  
Faculdade de Enfermagem Nova Esperança - FACENE

## DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a Deus, que me deu força durante toda a minha vida para que nenhum obstáculo fosse grande o suficiente para me fazer desistir dos meus sonhos.

Aos meus pais, Elenilda Marques D. da Cruz e Renato da Cruz, que são o meu alicerce.  
Me apoiam em todas as minhas decisões. São meus exemplos de vida.

A minha querida irmã e amiga de todas as horas, Rayssa Marques D. da Cruz que sempre me enriqueceu com seus ensinamentos e acreditou em mim.

A Leonardo do Vale Alves Nogueira, meu companheiro que sempre tão paciente me ajudou de todas as maneiras durante essa trajetória.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora, prof. Dr<sup>o</sup>. Marianna Vieira Sobral, que é um exemplo de pessoa dentro e fora da universidade. Acreditou em mim e sempre foi paciente e dedicada.

Às minhas companheiras do laboratório Tati Mota, Taty Kelvia, Vivianne, Aline, Monalisa, Renata, Jamilly, Daiene, Fernando, e Débora por sempre estarem dispostas a me passar os ensinamentos dentro do laboratório. Em especial a Tati Mota que me acompanhou em todas as etapas e esteve disposta a me ajudar em todos os momentos que precisei.

Às minhas amigas do LGM Vivyanne, Isis, Helena e Suellen que me ajudaram muito logo que iniciei minha vida acadêmica na pesquisa.

À minha grande amiga que fiz no curso de farmácia Gabrielle Souza que me vem me acompanhando desde o primeiro período, que sempre me ouviu e me deu forças quando precisei.

À minha família por sempre me apoiarem quando mais precisei.

À Universidade Federal da Paraíba (UFPB) pelo suporte, o qual permitiu o desenvolvimento do trabalho.

## RESUMO

Compostos cumarínicos são considerados produtos naturais por serem encontrados como metabólitos secundários das plantas. Estes pertencem a uma larga classe de constituintes fenólicos e podem ser classificados em: cumarinas simples, furanocumarinas e piranocumarinas. Seus derivados têm demonstrado uma gama de atividades farmacológicas tais como: anti-HIV, hepatoprotetora e anti-inflamatória. O derivado semi-sintético 2H-1-Benzopiran-2-ona, 7-preniloxi (UMB-07) apresentou uma atividade antibacteriana frente a linhagens resistentes de *Staphylococcus aureus*, visto que não há relatos na literatura sobre sua possível toxicidade, a avaliação de seu perfil toxicológico é fundamental para a determinação de informações que permita a escolha de doses seguras para continuação de seus estudos farmacológicos, incluindo ensaios *in vivo*. Diante disto, o presente estudo foi realizado para avaliar a toxicidade *in vivo* do UMB-07 que foram realizados de acordo com o OECD "Guidelines for testing of chemicals" n. 423/2001 o qual utilizaram-se camundongos Swiss, três fêmeas por grupo, incluindo o controle, estes foram submetidos a doses únicas de 300 e 2000 mg/kg de UMB-07 por via oral e ao grupo controle foi administrado apenas o veículo (solução a 12% de Tween 80). Na realização do ensaio de toxicidade aguda, não ocorreu morte nos animais tratados com 2.000 mg/kg e o valor de DL50 foi estimado em torno de 5000 mg/kg, indicando uma baixa toxicidade. Na avaliação da genotoxicidade determinou-se o número de eritrócitos micronucleados em sangue periférico. Para realização deste ensaio foram utilizados grupos de seis camundongos Swiss fêmeas que foram tratados por via oral (gavagem) com a dose de 2000 mg/kg, sendo um grupo padrão (ciclofosfamida - 50 mg/kg – v.o.) e um grupo controle (solução salina e tween 80 à 12%). Não foi evidenciado um aumento de eritrócitos micronucleados indicando uma baixa taxa de mutação e portanto, baixa genotoxicidade.

**Palavras-chave:** Derivado cumarínico, 2H-1-Benzopiran-2-ona, 7-preniloxi, genotoxicidade, toxicidade aguda.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Estrutura química da 2H-1- Benzopiran-2-ona, 7- preniloxi	14
<b>Tabela 1.</b> Efeitos da administração aguda de UMB-07 em camundongos	17
<b>Tabela 2.</b> Frequência de eritrócitos micronucleados em sangue periférico de camundongos tratados com UMB-07 e ciclofosfamida	18



## SUMÁRIO

1 Introdução	8
2 Objetivos	13
3 Materiais e métodos	14
3.1 Derivado semi-sintético cumarínico	14
3.2 Animais	14
3.3 Avaliação da toxicidade pré-clínica aguda de UMB-07	14
3.4 Avaliação da genotoxicidade em sangue periférico	15
3.4.1 Ensaio de micronúcleo em sangue periférico	15
3.5 Análise estatística	16
4 Resultados e discussão	17
4.1 Avaliação da toxicidade pré-clínica aguda de UMB-07	17
4.2 Avaliação da genotoxicidade de UMB-07	18
4.2.1 Ensaio do micronúcleo em sangue periférico	18
5 Conclusões	19
Referências	20
ANEXO I	29

## 1 Introdução

Durante séculos, produtos naturais, como exemplo as cumarinas, têm sido uma rica fonte de valor medicinal (GORDALIZA, 2007). Esses compostos são considerados produtos naturais por serem encontrados como metabólitos secundários das plantas (ZOBEL, 1997), são compostos pertencentes a uma larga classe de constituintes fenólicos, que possuem unidades de anéis benzeno e  $\alpha$ -pirona fusionados (compostos benzopirranônicos) (MAGGI *et al*, 2011). Estes podem ser classificados com base na sua estrutura química como: (a) cumarinas simples, (b) furanocumarinas dos tipos linear ou angular, e (c) piranocumarinas dos tipos linear ou angular (MARUMOTO, 2011) e ainda como: (d) dicumarinas, e (e) fenilcumarinas (MOSS, 2002).

As cumarinas podem ser provenientes de plantas, fungos e bactérias. Nos vegetais, supõe-se que realizem um papel de defesa após eventos de estresse físico ou químico, como ferimentos, ação de fitohormônios e/ou interação com microrganismos (SHIMIZU *et al*, 2005).

Sua origem biossintética se dá pela lactonização ou ciclização da cadeia lateral do ácido o-cumárico (2-hidro-Z-cumárico), um derivado da via do ácido chiquímico. Quase todas as cumarinas, exceto a cumarina propriamente dita (1,2 benzopirona) apresentam substituinte hidroxila na posição 7. A 7-hidroxi-cumarina (umbeliferona) é a precursora das cumarinas 6,7-dihidroxiladas e 6,7,8-tri-hidroxiladas. Pode ocorrer também a prenilação, adição de grupos isoprênicos com 5, 10 e 15 átomos de carbono em diversas posições do esqueleto cumarínico (SIMÕES *et al*, 2004).

Seus derivados têm demonstrado atividade frente a uma grande variedade de doenças, mostrando serem potentes como: anti-HIV (OLMEDO *et al*, 2012), hepatoprotetores (SAHEBKAR, 2011), anti-inflamatórios (ONUMA *et al*, 2011), antialérgicos (IBRAHIM, 2006), antimicrobianos (HAMDÍ *et al*, 2012), antimitóticos (IBRAHIM, 2006), antitumorais (BENCI *et al*, 2012), antioxidativos (CARPINELLA *et al*, 2005), possuidores de propriedades cardiovasculares (BORGES *et al*, 2005), antiagregante plaquetário (ZAVRŠNIK *et al*, 2011), antidepressivos (SASHIDHARA *et al*, 2011), anticoagulantes (STEFANOU *et al*, 2011). Devido a essa variedade de propriedades biológicas, essa tem sido uma classe que tem despertado bastante

interesse de pesquisadores por todo mundo (IBRAHIM, 2006; GARAZD *et al*, 2000; NAGORICHNA *et al*, 2003).

O derivado cumarínico semi-sintético 2H-1-Benzopiran-2-ona, 7-preniloxi (UMB-07) foi sintetizado pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas (LSVM) da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), coordenado pelo Professor Doutor Francisco Jaime Bezerra Mendonça Júnior. Esse composto foi obtido por uma rota sintética de alquilação, como descrito na literatura (ARAÚJO *et al*, 2013; CHUNG *et al*, 2012; EPIFANO *et al*, 2012).

Visto que esse composto apresentou atividade antibacteriana frente a linhagens resistentes de *Staphylococcus aureus*, em experimentos realizados no Laboratório de Genética de Micro-organismos (Departamento de Biologia Molecular) sob orientação do professor Jose Pinto de Siqueria Júnior, e o mesmo não possui dados toxicológicos, é fundamental a realização desses ensaios *in vivo* para o estudo da toxicidade pré-clínica que fornecerá informações que permitem a escolha de doses seguras para realização de outros protocolos, como a realização de ensaios pré-clínicos *in vivo*, clínicos e posterior produção de um medicamento.

A avaliação da toxicidade é realizada com o objetivo de determinar o potencial de novas substâncias e produtos causar danos à saúde humana. Além dos ensaios realizados para avaliar a genotoxicidade também podem ser feitos testes que avaliam a toxicidade sistêmica aguda, estes são utilizados para classificar e apropriadamente rotular substâncias de acordo com o seu potencial de letalidade ou toxicidade como estabelecido pela legislação (COECKE *et al*, 2005).

Além da letalidade, outros parâmetros são investigados em estudos de toxicidade aguda sistêmica para identificar o potencial tóxico em órgãos específicos, identificar a toxicocinética e a relação-dose resposta. Outras informações podem ainda ser obtidas numa avaliação de toxicidade aguda como: indicativos sobre o mecanismo de ação tóxica; diagnóstico e tratamento das reações tóxicas; estabelecimento das doses para estudos adicionais de toxicidade; informações para a comparação de toxicidade entre substâncias de mesma classe; informações sobre quais seriam as conseqüências de exposições acidentais no trabalho ou no ambiente doméstico; além de ser um padrão para a avaliação de testes alternativos ao uso de animais experimentais (PURCHASE *et al*, 1998; BLAAUBOER, 2003; PRIETO *et al*, 2006; COECKE *et al*, 2005).

Os estudos de toxicidade aguda são aqueles utilizados para avaliar a toxicidade produzida por uma substância teste quando esta é administrada em uma ou mais doses durante um período não superior a 24 horas, seguido de observação dos animais por 14 dias após a administração. Quando a via pretendida para uso em humanos for a oral, é recomendável a administração do produto em animais por gavagem. A dose limite a ser testada será de 1000 mg/kg/dia para roedores e não roedores. Em situações, em que essa dose não resulte em uma margem de 10 vezes a exposição clínica e a dose clínica exceda 1 grama por dia, deve ser considerada a menor dose disponível entre 10 vezes a exposição clínica, 2000 mg/kg/dia ou a máxima dose disponível (ANVISA, 2013).

Sendo, assim o estudo toxicológico pré-clínico de um produto é uma etapa inicial importante para seu uso seguro na saúde humana e ambiental, pois visa à caracterização dos efeitos tóxicos produzidos a partir de sua administração. Além disso, os estudos toxicológicos pré-clínicos tem o propósito de buscar informações para os pesquisadores clínicos sobre as doses capazes de provocar efeitos tóxicos em animais de laboratório (ALMEIDA, 2006).

No desenvolvimento de novos fármacos é de suma importância a realização de estudos de genotoxicidade (GOLLAPUDI *et al*, 2000; HARTMANN *et al*, 2001a; KISKINIS *et al*, 2002), devendo ser realizados nos estágios iniciais desse desenvolvimento a fim de constatar uma potencial atividade genotóxica e/ou carcinogênica e para auxiliar na obtenção de novas estruturas químicas menos tóxicas (GOLLAPUDI *et al*, 2000; SNYDER *et al*, 2001).

Os estudos de genotoxicidade são testes *in vitro* e *in vivo* desenhados para detectar o potencial das substâncias sob investigação de causar mutações gênicas e alterações cromossômicas (ANVISA, 2013).

Dentre os métodos para investigação de genotoxicidade *in vivo*, o teste de micronúcleo em camundongos tem sido amplamente empregado e aceito pelas agências reguladoras e comunidade científica (MATEUCA *et al*, 2006).

O teste do micronúcleo é realizado de diversas maneiras, dependendo das perguntas que o investigador quer responder, e pode variar de acordo com o organismo de teste, o tipo de célula que é testado, e o modo de ação do produto químico. Os testes em ratos ou camundongos, e os tecidos mais usados para avaliação da frequência de micronúcleos são medula óssea e sangue periférico. (MATEUCA *et al*, 2006).

Vários estudos demonstram que o sangue periférico pode ser utilizado de forma eficaz na detecção de agentes genotóxicos (ABRAMSSON-ZETTERBERG *et al*, 1999; ASANAMI *et al*, 1995; DERTINGER *et al*, 2006; HAMADA *et al*, 2001; HAYASHI *et al*, 1992; HYNES *et al*, 2002; ROMAGNA *et al*, 1989; WAKATA *et al*, 1998). Assim, o teste do micronúcleo realizado com amostras de sangue periférico se torna mais vantajoso, uma vez que dispensa o árduo trabalho de coleta de medula óssea dos animais, utiliza uma pequena quantidade de amostra de sangue para realização do ensaio, facilitando a integração do mesmo na rotina de estudos toxicológicos e/ou farmacológicos, sem a necessidade da realização de um ensaio em separado para avaliação de efeitos genotóxicos (ASANAMI *et al*, 1995; DERTINGER *et al*, 2006; HAMADA *et al*, 2001; MACGREGOR *et al*, 1995; WAKATA *et al*, 1998), e ainda permite uma contagem das células micronucleadas mais satisfatória, devido à uniformidade das células do sangue periférico quando comparadas às da medula óssea (COSTA E SILVA *et al*, 2010; HOOFTMAN *et al*, 1982;).

Esse teste baseia-se na observação de células que sofrem quebra de cromátides, ou alterações na distribuição de suas cromátides, devido à ação de agentes genotóxicos. Durante a anáfase (fase da divisão celular em que há a segregação dos cromossomos), os fragmentos provenientes das quebras ou cromossomos inteiros, não acompanham a migração para os pólos da célula. Consequentemente, na telófase que é a fase em que os cromossomos se descondensam e ocorre formação de um novo invólucro nuclear em torno de cada conjunto de cromossomos, tais fragmentos cromatídicos não são incluídos nos núcleos das células filhas, formando um único ou múltiplos micronúcleos no citoplasma dessas células (COSTA E SILVA *et al*, 2010).

Assim, o micronúcleo representa tanto uma alteração cromossômica estrutural como uma alteração numérica (SALVADORI, 2003). O aumento da frequência de micronúcleo é indicativo de elevação das taxas de mutações, ou seja, é um parâmetro que representa o aumento da instabilidade genética nas células, o que pode estar relacionado ao desenvolvimento de carcinomas (CARVALHO *et al*, 2002).

Durante a maturação das células da linhagem eritrocitária na medula óssea, o núcleo principal é expelido do eritrócito nucleado, enquanto os micronúcleos ficam

retidos. Estes pequenos núcleos são analisados principalmente em eritrócitos policromáticos (eritrócitos jovens).

O ensaio do micronúcleo tem sido amplamente usado para avaliar a genotoxicidade tanto *in vitro* quanto *in vivo*. O teste *in vivo* é especialmente relevante porque permite obter maiores informações sobre as condições experimentais, tais como o metabolismo, a farmacocinética e os processos de reparo do DNA. É usado primeiro para avaliar a habilidade da substância teste para induzir danos cromossômicos estruturais ou numéricos, ambos associados com o aparecimento e/ou progressão de tumores (KRISHNA *et al*, 2000).

Os eventos que levam à formação do MN podem ser induzidos pelo estresse oxidativo, exposição a agentes clastogênicos ou aneugênicos, defeitos genéticos nos pontos de checagem do ciclo celular e/ou nos genes de reparo do DNA e também pela deficiência de nutrientes requeridos como co-fatores no metabolismo do DNA e na maquinaria da segregação cromossômica (BONASSI *et al*, 2007).

Embora a toxicidade genética não seja indicativa de carcinogenicidade, esta é frequentemente associada ao aparecimento do câncer, visto que, existe uma correlação positiva entre o aumento da frequência de micronúcleos e o aparecimento de tumores em roedores e no homem (DE OLIVEIRA AZEVEDO *et al*, 2003; REZENDE *et al*, 2006).

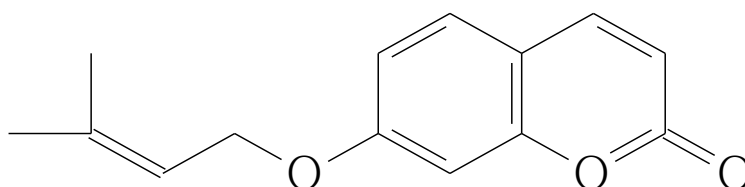
## 2 Objetivos

- Avaliar a toxicidade pré-clínica aguda do derivado semi-sintético cumarínico 2H-1-benzopiran-2-ona, 7- preniloxi em camundongos albinos Swiss, com base no OECD “Guidelines for testing of chemicals” n. 423/2001.
- Avaliar a genotoxicidade do derivado semi-sintético cumarínico 2H-1-benzopiran-2-ona, 7- preniloxi através do teste do micronúcleo em sangue periférico de camundongos.

### 3 Material e Métodos

#### 3.1 Derivado semi-sintético cumarínico

O derivado cumarínico UMB-07 semi-sintético 2H-1-Benzopiran-2-ona, 7- preniloxi (UMB-07) (Figura 1) foi fornecido pelo Professor Doutor Francisco Jaime Bezerra Mendonça Júnior, pesquisador e colaborador do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PPgPNSB).



**Figura 1.** Estrutura química da 2H-1- Benzopiran-2-ona, 7- preniloxi

#### 3.2 Animais

Foram utilizados camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*), pesando entre 28 e 32 g, e com aproximadamente oito semanas, obtidos do Biotério Prof. Thomas George (IPeFarM/UFPB). Os animais foram agrupados em gaiolas de polietileno, mantidos sob temperatura controlada de  $21 \pm 1$  °C, sem uso de qualquer medicação, tendo livre acesso à comida (tipo *pellets* de ração da marca Purina®) e água potável. Antes da realização de qualquer protocolo experimental, os animais foram colocados no ambiente de trabalho por pelo menos 30 minutos de antecedência à execução do experimento. Os animais foram mantidos em ciclo claro-escuro de 12 horas. Todos os procedimentos experimentais foram analisados e previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Uso Animal da UFPB (CEUA), sob a certidão 3405/14.

#### 3.3 Avaliação da toxicidade pré-clínica aguda do UMB-07

Os ensaios de toxicidade aguda em camundongos foram realizados de acordo com o OECD “Guidelines for testing of chemicals” n. 423/2001 (Anexo 1).



Camundongos Swiss, três fêmeas por grupo, incluindo o controle, foram submetidos a doses únicas de 300 e 2000 mg/kg de UMB-07 por via oral e ao grupo controle foi administrado apenas o veículo (solução a 12% de Tween 80). O nível de dose para ser usada como a dose de partida é selecionado a partir de um dos quatro níveis fixos, 5, 50, 300 e 2000 mg/kg. Quando não existe qualquer informação sobre a amostra a ser testada, por razões de proteção dos animais, recomenda-se a utilização de uma dose inicial de 300 mg/kg. Em princípio, o método não se destina a permitir o cálculo preciso da DL50 (apesar de fornecer uma estimativa do seu valor), entretanto permite uma classificação da substância em categorias de acordo com o “Globally Harmonized Classification System” – GHS.

Com o objetivo de mapear possíveis alterações comportamentais, sugestivas de atividade sobre o Sistema Nervoso Central (SNC) ou Sistema Nervoso Autônomo (SNA) após administração da substância, foi realizada observação cuidadosa para detecção de possíveis sinais tóxicos como hiperatividade, irritabilidade, agressividade, tremores, convulsões, catatonia, analgesia, anestesia, ptose, resposta ao toque diminuído, ambulação, capacidade de limpeza e ato de levantar, nos intervalos: 0, 15, 30 e 60 minutos e após 4 horas; e diariamente durante 14 dias, utilizando-se protocolo experimental descrito por Almeida et al. (1999) do Laboratório de Psicofarmacologia do PPgPNSB/CCS/UFPB.

### **3.4 Avaliação da genotoxicidade do UMB-07**

#### **3.4.1 Ensaio do micronúcleo em sangue periférico**

Para o ensaio do micronúcleo em sangue periférico, grupos de seis camundongos Swiss fêmeas foram tratados por via oral (gavagem) com a dose de 2000 mg/kg. Um grupo padrão (ciclofosfamida - 50 mg/kg – v.o.) e um grupo controle (solução salina e tween 80 à 12%) foram incluídos. Após um período 48 horas após a administração, os animais foram submetidos a um pequeno corte na cauda para obtenção de uma amostra de sangue e confecções das extensões sanguíneas. Após secagem, as lâminas foram coradas com coloração panótica (Newprov®) para posterior análise em microscópio óptico. Para cada animal, três extensões sanguíneas foram preparadas e um mínimo de 2000 eritrócitos contados para determinação da frequência de eritrócitos micronucleados (OECD, 1997).

### 3.4.2 Análise estatística

Os resultados obtidos nos ensaios do micronúcleo em sangue periférico foram analisados por teste de análise de variância (ANOVA) *one-way*, para a comparação de mais de duas amostras, seguido do pós teste de Tukey (para variáveis paramétricas). Os resultados foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ .

## 4 Resultados e discussão

### 4.1 Avaliação da toxicidade pré-clínica aguda do UMB-07

No ensaio de toxicidade pré-clínica aguda foi observado que UMB-07 não provocou mortes nas doses de 300 mg/kg e 2000 mg/kg, como mostrado na tabela 1. O valor de DL50 foi estimado, segundo o guia OECD nº 423, em torno de 5000 mg/kg (ANEXO I).

Após a observação de possíveis sinais tóxicos, não foram evidenciadas alterações no Sistema Nervoso Autônomo (SNA). Porém, em relação ao Sistema Nervoso Central (SNC) foi observado nos tempos de 30 e 60 minutos, tanto na dose de 300 mg/kg quanto na dose de 2000 mg/kg, uma resposta diminuída ao toque, que é avaliada pelo estalar de dedos ou fricção de uma caneta sobre as barras metálicas de uma gaiola onde há uma demora da reação do animal com um sobressalto ou emitindo sons, podendo indicar um estágio de depressão do SNC do animal. (ALMEIDA, 2006)

Portanto, os dados apresentados mostram que UMB-07 apresenta baixa toxicidade nas condições avaliadas, o que fornece subsídios para a realização de ensaios farmacológicos *in vivo*, permitindo a escolha de doses seguras para a realização destes testes.

**Tabela 1** - Efeitos da administração aguda de UMB-07 em camundongos.

Grupo	Experimento	M/T	Sintomas
Controle	-	0/3	Nenhum
300 mg/kg	1	0/3	Resposta ao toque diminuído
	2	0/3	Resposta ao toque diminuído
2000 mg/kg	1	0/3	Resposta ao toque diminuído
	2	0/3	Resposta ao toque diminuído

M/T – morte/tratado

## 4.2 Avaliação da genotoxicidade

### 4.2.1 Ensaio do micronúcleo em sangue periférico

Para avaliar o possível efeito genotóxico *in vivo* de UMB-07 foi realizado o ensaio do micronúcleo em sangue periférico de camundongos, cujo resultado está apresentado na Tabela 2. O tratamento dos animais com a dose de 2000 mg/kg não induziu aumento na frequência de eritrócitos micronucleados em sangue periférico quando comparado ao grupo controle (12% Tween-80).

Sendo o aumento desse tipo de eritrócito um indicativo das taxas de mutações, que representa um aumento de instabilidade genética e se relaciona com o desenvolvimento de carcinoma, implica que esse tipo de avaliação é imprescindível quando se utiliza substâncias por longo período de tempo e portanto, a ausência desse efeito é essencial para garantir a segurança de seu uso (CARVALHO *et al*, 2002).

**Tabela 2** - Frequência de eritrócitos micronucleados em sangue periférico de camundongos tratados com UMB-07 e ciclofosfamida.

Grupos	Dose (mg/kg)	Nºde animais	Total de células	Células micronucleadas
Controle	-	6	2000	8,33 ± 0,99
Ciclofosfamida	50 mg/kg	6	2000	18,20 ± 1,56 <sup>a</sup>
UMB-07	2000 mg/kg	6	2000	6,17 ± 0,60

Dados apresentados como média ± erro padrão da média de seis animais. <sup>a</sup> p < 0,05 comparado ao grupo controle (12% Tween 80) por ANOVA por Tukey.

## 5 Conclusões

A partir dos dados obtidos, é possível concluir que UMB-07 mostrou baixa toxicidade aguda *in vivo* e não mostrou efeito genotóxico no ensaio de micronúcleo em sangue periférico de camundongos.

Portanto, é possível afirmar que UMB-07 possui baixa toxicidade nos modelos experimentais avaliados, fornecendo subsídios importantes relacionados à sua segurança para realização de estudos farmacológicos posteriores.

## 6 Referências

- ABRAMSSON-ZETTERBERG, L.; GRAWE, J.; ZETTERBERG, G. The micronucleus test in rat erythrocytes from bone marrow, spleen and peripheral blood: The response to low doses of ionizing radiation, cyclophosphamide and vincristine determined by flow cytometry. **Mutation Research**, v. 423, n. 1-2, 113-124, 1999.
- ALMEIDA, R. N. **Psicofarmacologia: fundamentos práticos**. Guanabara Koogan, 357p, Rio de Janeiro, 2006.
- ALMEIDA, R. N.; FALCÃO, A. C. G. M.; DINIZ, R. S. T.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; POLARI, R. N.; BARBOSA-FILHO, J. M.; AGRA, M. F.; DUARTE, J. C.; FERREIRA, C. D.; ANTONIOLLI, A. R.; ARAÚJO, C. C. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no Sistema Nervoso Central e alguns dados experimentais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 80, p. 72-76, 1999.
- ARAÚJO, R.S.A., GUERRA, F.Q.S., LIMA, E.O., DE SIMONE, C.A., TAVARES, J.F., SCOTTI, L., SCOTTI, M.T., AQUINO, T.M., MOURA, R.O., MENDONÇA Jr F.J.B., BARBOSA-FILHO, J.M. (2013) Synthesis, Structure-Activity Relationships (SAR) and in Silico Studies of Coumarin Derivatives with Antifungal Activity. **Int J Mol Sci** 14:1293-1309.
- ASANAMI, S.; SHIMONO, K.; SAWAMOTO, O.; KURISU, K.; AND UEJIMA; M. The suitability of rat peripheral blood in subchronic studies for the micronucleus assay. **Mutation Research**, v. 347, n. 2, p. 73-78, 1995.
- BENCI, K.; MANDIC, L.; Suhina, T.; et al. Novel coumarin derivatives containing

1,2,4- triazole, 4,5-dicyanoimidazole and purine moieties: Synthesis and evaluation of their cytostatic activity. **Molecules**. v. 17, p. 11010-11025, 2012.

- BONASSI, S.; ZNAOR, A.; CEPPI, M.; LANDO, C.; CHANG, W. P.; HOLLAND, N.; KIRSCH-VOLDERS, M.; ZEIGER, E.; BAN, S.; BARALE, R.; BIGATTI, P.; BOLOGNESI, C.; CEBULSKA-WASILEWSKA, A.; FABIANOVA, E.; FUCIC, A.; HAGMAR, L.; GORDANA, J.; MARTELLI, A.; MIGLIORE, L.; MIRKOVA, E.; SCARFI, M.; ZIJNO, A.; NORPPA, H.; FECECH, M. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. **Carcinogenesis**. 28(3): 625-631, 2007.
- BLAAUBOER, B. J. Biokinetic and toxicodynamic modelling and its role in toxicological research and risk assessment. **Alternatives to laboratory animals**. v.31 n. 3, p. 277-281, 2003.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos**. Brasília, DF 2013.
- PRIETO, P.; BAIRD, A. W.; BLAAUBOER, B. J.; CASTELL RIPOLL, J. V.; CORVI, R.; DEKANT, W.; DIETL, P.; GENNARI, A.; GRIBALDO, L.; GRIFFIN, J. L.; HARTUNG, T.; HEINDEL, J. J.; HOET, P.; JENNINGS, P.; MAROCCHIO, L.; NORABERG, J.; PAZOS, P.; WESTMORELAND, C.; WOLF, A.; WRIGHT, J.; PFALLER, W. The assessment of repeated dose toxicity in vitro: a proposed approach. The report and recommendations of ECVAM workshop 56. **Alternatives to laboratory animals**. v. 34, n. 3, p.315-41, 2006.
- BORGES, F.; ROLEIRA, F.; MILHAZES, N.; et al. Simple coumarins and analogues in medicinal chemistry: Occurrence, synthesis and biological activity. **Curr Med**

**Chem.** v. 12, p. 887-916, 2005.

- CARPINELLA, M. C.; FERRAYOLI, C. G.; PALACIOS, S. M. Antifungal synergistic effect of scopoletin, a hydroxycoumarin isolated from *Melia azedarach* L. fruits. **J Agric Food Chem.** v. 53, p. 2922-2927, 2005.
- CARVALHO, M. B.; RAMIREZ, A.; GATTÁS, G. R. F.; GUEDES, A.L.; AMAR, A.; RAPOPORT, A.; NETO, J. C. B.; CURIONI, O. A. Correlação entre a evolução clínica e a frequência de micronúcleos em células de pacientes portadores de carcinomas orais e da orofaringe. **Rev Assoc Méd Brás.** 48(8): 317-322, 2002.
- CHUNG, J.W.; LEE, K.; NEIKIRK, C.; NELSON, C.M.; Priestley, R.D. Photoresponsive coumarinstabilized polymeric nanoparticles as a detectable drug carrier. **Small** 2012, 8, 1693–1700.
- COECKE, S., BLAAUBOER, B. J.; ELAUT, G.; FREEMAN, S.; FREIDIG, A.; GENSMANTEL, N.; HOET, P.; KAPOULAS, V. M.; LADSTETTER, B.; LANGLEY, G.; LEAHY, D.; MANNENS, G.; MENEGUZ, A.; MONSHOUWER, M.; NEMERY, B.; PELKONEN, O.; PFALLER, W.; PRIETO, P.; PROCTOR, N.; ROGIERS, V.; ROSTAMI-HODJEGAN, A.; SABBIONI, E.; STEILING, W.; VAN DE SANDT, J. J. Toxicokinetics and metabolism. **Alternatives to laboratory animals.** suppl 1, p. 147-175, 2005.
- COSTA E SILVA, A.; NEPOMUCENO, J. C. Avaliação da frequência de micronúcleos em eritrócitos periféricos de mandi-amarelo (*Pimelodus maculatus*) do rio Paranaíba. **Revista do Núcleo Interdisciplinar de Pesquisa e Extensão do UNIPAM,** v. 1, p. 167-179, 2010.



- DERTINGER, S. D.; BISHOP, M. E.; MCNAMEE, J. P.; HAYASHI, M.; SUZUKI, T.; ASANO, N.; NAKAJIMA, M.; SAITO, J.; MOORE, M.; TOROUS, D. K.; MACGREGOR, J. T. Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes: i. intra- and interlaboratory comparison with microscopic scoring. **Toxicological Sciences**, v. 94, n. 1, p. 83-91, 2006.
- DE OLIVEIRA AZEVEDO, M. et al. **Técnicas básicas em biologia molecular**. Brasília: Ed. Universidade de Brasília, 2003. ISBN 8523006850.
- EPIFANO, F.; GENOVESE, S.; SQUIRES, E.J.; Gray, M.A. Nelumal A, the active principle from *Ligulariane lumbifolia*, is a novel farnesoid X receptor agonist. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** 2012, 22, 3130–3135.
- GARAZD, M. M.; Garazd, Y. L.; Shilin, S. V.; et al. Modified coumarins. I. Synthesis of 5-phenyl-7H-furo[2,3-g]chromen-7-ones and 9-phenyl-7H-FURO-[2,3-F]CHROMEN-7-ONES. **Chem Nat Compd.** v. 36, n. 5, p. 478-484, 2000.
- GOLLAPUDI, B.B.; KRISHNA, G. Pratical aspects of mutagenicity testing strategy: an industrial perspective. **Mutation Research**, v. 455, p. 21-28, 2000.
- GORDALIZA, M. Natural products as leads to anticancer drugs. **Clin Transl Oncol.** v. 9, p. 767-776, 2007.
- HAMADA, S.; SUTOU, S.; MORITA, T. et al. Evaluation of the Rodent Micronucleus Assay by a 28-Day Treatment Protocol: Summary of the 13th Collaborative Study by The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT)/Environmental Mutagen Society of Japan (JEMS)-Mammalian

Mutagenicity Study Group (MMS). **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 37, p. 93-110, 2001.

- HAMDI, N.; AL-AYED, A. S.; SAID, R. B.; et al. Synthesis and characterization of new thiazolidinones containing coumarin moieties and their antibacterial and antioxidant activities. **Molecules**, v. 17, p. 9321-9334, 2012.
- HARTMANN, A., ELHAJOUJI, A.; KISKINIS, E.; POETTER, R.; MARTUS, H.J.; FJALLMAN, A.; FRIEAUFF, W.; SUTER, W. Use of the alkaline Comet assay for industrial genotoxicity screening: comparative investigation with the micronucleus test. **Food and Chemical Toxicology**, v. 39, p. 843-858, 2001a.
- HAYASHI, M. et al. *In vivo* erythrocyte micronucleus assay III. Validation and regulatory acceptance of automated scoring and the use of rat peripheral blood reticulocytes, with discussion of non-hematopoietic target cells and a single dose-level limit test. **Mutation Research**, v. 627, p. 10-30, 2007
- HOOFTMAN, R. N.; RAAT, W. K. Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmaea* by ethyl methanesulphonate. **Mutation Research Letters**, n. 104, n. 1-3, p. 147-152, 1982.
- HYNES, G. M.; TOROUS, D. K.; TOMETSKO, C. R.; BURLINGSON, B.; GATEHOUSE, D. G. The single laser flow cytometric micronucleus test: A time course study using colchicines and urethane in rat and mouse peripheral blood and acetaldehyde in rat peripheral blood. **Mutagenesis**, v. 17, n. 1, p. 15-23, 2002.

- IBRAHIM, N. M. The behavior of certain coumarins and furanocoumarins toward sulfur reagents. **Phosphorus, Sulfur, and Silicon**. v. 181, p. 1773-1784, 2006.
- KISKINIS, E.; SUTER, W.; HARTMANN, A. High throughput Comet assay using 96-well plates. **Mutagenesis**, v. 17, p. 37-43, 2002.
- KRISHNA, G.; HAYASHI, M. In vivo rodent micronucleus assay: Protocol, conduct and data interpretation. . **Mutation Research**, v. 455, p. 155-166, 2000.
- MATEUCA, R.; LOMBAERT, N.; AKA, P.V.; DECORDIER, I., KIRSCH-VOLDERS, M. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. **Biochimie**, v.88, p.515-1531, 2006
- MACGREGOR, J. T.; TUCKER, J. D.; EASTMOND, D. A.; WYROBEK, A. J. Integration of cytogenetic assays with toxicology studies. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 25, n. 4, p. 328-337, 1995.
- MAGGI, F.; BARBONI, L.; CAPRIOLI, G.; *et al.* HPLC quantification of coumarin in bastard balm (*Melittis melissophyllum* L., Lamiaceae). **Fitoterapia**. v. 82, n. 8, 1215-1221, 2011.
- MARUMOTO, S.; MIYAZAWA, M. Microbial reduction of coumarin, psoralen, and xanthyletin by *Glomerella cingulate*. **Tetrahedron**. v. 67, p. 495-500, 2011.
- MOSS, M. O. Mycotoxins review-1. Aspergillus and Penicillium. **Mycologist**. v. 16, p. 116- 119, 2002.

- NAGORICHNA, I. V.; DUBOVIK, I. P.; GARAZD, M. M.; et al. Substituted 2-(7-oxofuro[3,2-g]chromen-6-yl) acetic acids, modified psoralen analogs, were synthesized by linear fusion of a furan ring to the coumarin system. **Chem Nat Compd.** v. 39, p. 253-261, 2003.
- OECD (1997). Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. **OECD Guideline for testing of chemicals** No 474.
- OECD (2001). Acute Oral toxicity. **OECD Guideline for testing of chemicals** No 423.
- OLEMEDO, D.; SANCHO, R.; BEDOYA, L. M.; et al. 3-Phenylcoumarins as inhibitors of HIV-1 replication. **Molecules.** v. 17, p. 9245-9257, 2012.
- ONUMA, K.; SUENAGA, Y.; SAKAKI, R.; et al. Development of a quantitative bioassay to assess preventive compounds against inflammation-based carcinogenesis. **Nitric Oxide-Biol. Ch.** v. 25, p. 183-194, 2011.
- PURCHASE, I. F.; BOTHAM, P. A.; BRUNER, L. H.; FLINT, O. P.; FRAZIER, J. M.; STOKES, W. S. Workshop overview: scientific and regulatory challenges for the reduction, refinement, and replacement of animals in toxicity testing. **Toxicological Sciences.** v.43, n.2, p.86-101, 1998.
- REZENDE, O. S. J.; PALHAES, L. B.; CUNHA, L. C. **Intoxicações por plantas tóxicas notificadas no CIT - Centro de Informação Toxicológica de Goiás no período de 2001 a 2005.** Goiânia: Universidade Federal de Goiás, 2006. 72p .

- ROMAGNA, F.; STANFORTH, C. D. The automated bone marrow micronucleus test. **Mutation Research**, v. 213, p. 91-104, 1989
- SALVADORI, D.M.F.; RIBEIRO, L.R.; FENECH, M. Teste do micronúcleo em células humanas *in vitro*. In: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. **Mutagenese Ambiental**. Canoas: ULBRA, 2003. cap. 8, p.201-223.
- SAHEBKAR, A. Citrus auraptene: A potential multifunctional therapeutic agent for nonalcoholic fatty liver disease. **Ann Hepatol**. v. 10, p. 575-577, 2011.
- SASHIDHARA, K. V.; KUMAR, A.; CHATTERJEE, M.; et al. Discovery and synthesis of novel 3-phenylcoumarin derivatives as antidepressant agents. **Bioorg Med Chem Lett**. v. 21, p. 1937-1941, 2011.
- SHIMIZU, B. I.; MIYAGAWA, H.; Ueno, T.; et al. Morning glory systematically accumulates scopoletin and scopolin after interaction with *Fusarium oxysporum*. **Z. Naturforsch**. v. 60, p. 83-90, 2005.
- SIMÕES, C. M.; SHENKEL, E. P. GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A., PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2004. 1102p.
- SNYDER, R.D.; GREEN, J.W. A review of the genotoxicity of marketed pharmaceuticals. **Mutation Research**, v. 488, p. 151-169, 2001.
- STEFANOPOULOS, V.; MATIDIS, D.; MELAGRAKI, G.; et al. Functionalized 4-hydroxy

coumarins: Novel synthesis, crystal structure and DFT calculations. **Molecules**. v. 16, p. 384- 402, 2011.

- WAKATA, A.; MIYAMAE, Y.; SATO, S.; SUZUKI, T.; MORITA, T.; ASANO, N.; AWOGI, T.; KONDO, K.; HAYASHI, M. Evaluation of the rat micronucleus test with bone marrow and peripheral blood: Summary of the 9th collaborative study by SGMT/JEMS.MMS. **Environmental Molecular Mutagenesis**, v. 32, n. 1, p. 84-100, 1998.
- ZAVRŠNIK, D.; MURATOVIĆ, S.; MAKUC, D.; et al. Benzylidene-bis-(4-hydroxycoumarin) and Benzopyrano-coumarin derivatives: Synthesis, <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C-NMR conformational and X-ray crystal structure studies and in vitro antiviral activity evaluations. **Molecules**. v. 16, p. 6023- 6040, 2011.
- ZOBEL, A. M. Coumarins in fruit and vegetables. **Oxford Science**. p. 173-204, 1997

**ANEXO I** - Procedimento de ensaio com uma dose inicial de 5 mg/kg de peso corporal.

